

RÉPUBLIQUE FRANÇAISE

INSTITUT NATIONAL  
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE

PARIS

(11) N° de publication :

2 262 109

(A n'utiliser que pour les  
commandes de reproduction).

A1

DEMANDE  
DE BREVET D'INVENTION

(21)

N° 75 05409

(54) Procédé de purification du pullulane.

(51) Classification internationale (Int. Cl.<sup>2</sup>). C 12 D 13/04.

(22) Date de dépôt ..... 21 février 1975, à 14 h 11 mn.

(33) (32) (31) Priorité revendiquée : *Demande de brevet déposée au Japon le 23 février 1974,*  
*n. 21.783/1974 au nom de la demanderesse.*(41) Date de la mise à la disposition du  
public de la demande ..... B.O.P.I. — «Listes» n. 38 du 19-9-1975.(71) Déposant : Société dite : KABUSHIKI KAISHA HAYASHIBARA SEIBUTSU KAGAKU  
KENKYUJO, résidant au Japon.

(72) Invention de : Koso Kato et Tatsuo Nomura.

(73) Titulaire : *Idem* (71)

(74) Mandataire : Armand Kohn, 5, avenue Foch, 92380 Garches.

La présente invention concerne un procédé de purification par étapes successives du pullulane.

Des procédés de fabrication du pullulane ont été rapportés par H. Bender et coll. Biochim. Biophys. Acta 36, 301-316 (1959), Seinosuke Ueda, Journal of the Chemical Society of Japan, Industrial Chemistry Section, 67, 757-760 (1960), notamment. Dans ces procédés, le pullulane est fabriqué et purifié par des stades comprenant la culture d'une souche d'Aureobasidium pullulans en milieu liquide, et le traitement du bouillon de culture renfermant le pullulane ainsi obtenu par des opérations telles que séparation par centrifugation pour éliminer les cellules, décoloration du liquide surnageant, et addition ultérieure à celui-ci d'un solvant organique (désigné par la suite sous le terme de solvant) tel que méthanol, éthanol ou acétone, pour précipiter et séparer le pullulane. Cependant, le précipité de pullulane obtenu par ces procédés renferme encore 40 à 60% (poids/poids) d'eau, même si la quantité de solvant, ajoutée au bouillon de culture contenant le pullulane, est double ou triple, en volume, de celle du bouillon, et les impuretés présentes dans le précipité de pullulane, c'est-à-dire sucres résiduels tels que mono- et oligo-saccharides, pigments, protéines et sels minéraux, ne peuvent être éliminées par simple séchage de celui-ci. En outre, la purification supplémentaire nécessaire et la déshydratation de ce précipité entraînent une consommation supérieure de solvant anhydre, ce qui, en fin de compte, augmente le coût de la production. De plus, le précipité de pullulane, renfermant 40 à 60% d'eau (poids/poids), s'agglomère parfois pour former une masse collante, dont le traitement ultérieur s'avère difficile.

La présente invention permet d'éviter ces inconvénients de l'art antérieur et d'obtenir du pullulane de pureté élevée par purification par étapes successives, empêchant la formation de masses poisseuses de précipité et réduisant grandement la consommation en solvant.

Le nouveau procédé selon l'invention consiste à introduire une solution aqueuse de pullulane, obtenue par culture en milieu liquide d'une souche productrice de pullulane, suivie de l'élimination des cellules du bouillon résultant, (désigné ci-après par : solution de pullulane), dans une solution aqueuse de solvant (dénommée : solution de solvant), de manière à obtenir un mélange, dans lequel sont en suspension de façon homogène des particules

COPY

extrêmement fines de pullulane, et de diriger ce mélange vers une cuve voisine, renfermant la même solution de solvant, mais à une concentration plus élevée, et à répéter ces étapes au moins une fois pour obtenir un pullulane pratiquement anhydre et beaucoup plus pur, sous forme pulvérulente. Ce procédé empêche l'agglomération des particules de pullulane en masses collantes et permet l'automatisation de la fabrication du pullulane.

Afin d'empêcher la dilution des solutions de solvant dans les cuves de purification du pullulane, on fournit habituellement des quantités supplémentaires de solvant pour maintenir la concentration désirée. Au contraire, conformément à l'invention, on peut réduire la quantité de solvant utilisée par introduction d'une solution de solvant de concentration élevée dans la cuve, où le taux de dilution de la solution de solvant par l'apport de solution de pullulane est le plus bas, et transfert ultérieur de la solution de solvant dans la cuve adjacente, où le taux de dilution est supérieur. Ainsi, la purification du pullulane peut être obtenue facilement avec une quantité réduite de solvant.

L'unique figure du dessin est une vue schématique d'un appareil pour la purification du pullulane par étapes successives, donné en tant que forme de réalisation préférée de l'invention.

L'invention est illustrée plus en détail ci-après, avec référence à cette figure. Les cuves de purification 1 à 3, du pullulane, sont installées en série, et reliées par les canalisations 4 et 5, qui respectivement vont des cuves 1 et 2, aux cuves 2 et 3. Chaque cuve contient une solution de solvant de concentration différente, allant en ordre croissant. La concentration en solvant de la cuve 1 est légèrement supérieure au minimum nécessaire pour précipiter le pullulane, par exemple supérieur à 70% (vol./vol.), tandis que celle de la cuve 2 est supérieure à celle de la cuve 1, mais inférieure à celle de la cuve 3, qui est elle-même suffisante pour que soit maintenu un équilibre avec le pullulane ayant une teneur en humidité de quelques pourcents. Ainsi, la concentration de chaque cuve est toujours maintenue à un niveau inférieur à celui de la cuve suivante. La teneur en solvant de chaque cuve peut être aussi basse que la quantité minimale nécessaire pour déshydrater le pullulane. Cependant, comme la durée nécessaire pour éliminer l'eau et les impuretés varie en proportion des dimensions des particules de pullulane, il est préférable, par précaution, d'utiliser la quantité la plus grande possible. En général, cette quan-

tité est déterminée par la capacité de la cuve. La durée de retenue des particules de pullulane dans les cuves 1, 2 et 3, est en moyenne de 10 à 60 minutes.

La cuve 6, servant au stockage, contient la solution de pullulane, qui en est expulsée vers la cuve 1 au moyen de la pompe 7. L'expulsion de la solution de pullulane sous forme d'un fin brouillard, facilite la purification et la mise en suspension du pullulane dans le solvant et l'empêche de former des masses par agglomération et collage. En conséquence, il est préférable d'éjecter la solution de pullulane dans le solvant sous forme de fin brouillard, par pulvérisation au travers d'un ajutage à pression élevée 8, ou bien par introduction au moyen d'un disque tournant, avec agitation vigoureuse et continue de la solution de solvant dans la cuve 1. En outre, il s'avère très efficace pour la purification du pullulane, d'expulser sa solution à une concentration aussi élevée que possible, mais de préférence ne dépassant pas 40% (poids/vol.), sous forme de fin brouillard, et à une température ne dépassant pas 200°C. La solution ainsi expulsée dans la cuve 1 se met en suspension au contact de la solution de solvant, pour former de fines particules. Ces particules de pullulane en suspension ont une teneur en humidité proche de celle de la solution de solvant.

La pompe 9, fixée sur la canalisation 4 allant de la cuve 1 à la cuve 2, sert à transférer le mélange, c'est-à-dire la suspension de pullulane, de la cuve 1 à la cuve 2. L'hydrocyclone 10, fixé sur la canalisation 4, fonctionne comme moyen de séparation du mélange en une fraction de solution de solvant et une fraction de suspension concentrée de pullulane, cette dernière étant simultanément introduite dans la cuve 2. Les particules de pullulane, présentes dans la suspension qui est introduite dans la cuve 2, sont débarrassées des impuretés et déshydratées par la solution de solvant ayant une concentration de solvant supérieure à celle de la cuve 1, pour former un mélange, dans lequel les particules de pullulane résultantes sont en suspension. La solution de solvant séparée est envoyée dans une colonne 11 où elle est distillée. La solution concentrée de solvant est alors dirigée vers une cuve 12 de stockage du solvant.

La pompe 13, fixée sur la canalisation 5 allant de la cuve 2 à la cuve 3, sert à transférer le mélange obtenu dans la cuve 2 vers la cuve 3. L'hydrocyclone 14, monté sur la canalisation 5, fonctionne comme moyen de séparation du mélange en une fraction

de solution de solvant et une autre fraction de suspension de pullulane concentré, cette dernière étant simultanément introduite dans la cuve 3. Les particules de pullulane, présentes dans cette suspension introduite dans la cuve 3, sont débarrassées des impuretés et déshydratées à une teneur en humidité de quelques pourcents, par la solution de solvant ayant la concentration la plus élevée de celles des trois cuves, pour former un mélange dans lequel sont suspendues les particules résultantes de pullulane non visqueux. La solution de solvant séparée est retournée vers la cuve 1 pour empêcher dans celle-ci la dilution de la solution de solvant par l'apport de la solution de pullulane. La pompe 15 fixée sur la canalisation 17 fonctionne comme moyen de transport du mélange obtenu dans la cuve 3, vers la centrifugeuse du type à l'épreuve de l'explosion 16, par la canalisation 17. L'hydrocyclone 18 fixé sur cette même canalisation, sert à séparer le mélange en provenance de la cuve 3 en une fraction de solution de solvant et une fraction de suspension de pullulane à nouveau concentrée, cette dernière étant simultanément introduite dans la centrifugeuse 16.

La partie solution de solvant de la suspension de pullulane, est ensuite séparée dans la centrifugeuse 16, pour donner le précipité de pullulane. On peut obtenir le pullulane sous forme pulvérulente par séchage de ce précipité dans un séchoir à vide 19. La solution de solvant éliminée de l'hydrocyclone 18 et de la centrifugeuse 16, est envoyée dans la cuve 2 pour empêcher la dilution de la solution de solvant dans cette cuve par apport de solution de pullulane. La pompe 20 sert à diriger la solution concentrée de solvant de la cuve de stockage 12 vers la cuve 3, afin d'y empêcher la dilution de la solution de solvant par apport de la solution de pullulane.

Dans le système décrit ci-dessus, la quantité totale des solutions de solvant et de pullulane introduites est maintenue équivalente à la quantité totale de solution de solvant éliminée de l'hydrocyclone 10 et de pullulane obtenu à partir du séchoir à vide 19. Les teneurs des cuves 1, 2 et 3 sont maintenues respectivement à des niveaux constants par ajustage des apports en provenance des hydrocyclones 10, 14 et 18.

On peut utiliser conformément à l'invention, des solvants facilement ou partiellement hydrosolubles tels qu'alcools, cétones, esters, éthers, etc. Conviennent plus particulièrement

méthanol, éthanol, propanol, isopropanol, alcool n-butylique ou sec-butylique, acétate de méthyle, tétrahydrofuranne, dioxanne, éther monoéthylique ou monobutylique de l'éthylène glycol, éther monométhylique du diéthylène glycol, méthyl éthyl cétone, hydroxy-  
5 4 méthyl-4 pentanone-2 et acétylacétone.

En utilisant ces solvants à la concentration minimale, nécessaire pour précipiter le pullulane, on peut réduire la quantité de solvant utilisée à un niveau grandement inférieur à celui qui est requis pour un procédé de type discontinu, et, de plus, on obtient  
10 un pullulane pulvérisé pratiquement anhydre et de beaucoup plus grande pureté.

Un autre avantage de l'invention provient du fait que les particules de pullulane peuvent être mises en suspension, même si une couche liquide de pullulane se forme dans une cuve qui contient une concentration inférieure de solvant et ne collent pas à  
15 la paroi interne de cette cuve, lors de l'introduction de la couche liquide de pullulane, sous forme de fin brouillard, dans la cuve suivante.

Un avantage supplémentaire de l'invention, réside dans le fait que l'on peut parvenir à un résultat identique à celui qui est indiqué plus haut, même s'il se forme deux à trois couches, notamment solution aqueuse de pullulane, une couche de solvant contenant de l'eau et une couche d'eau contenant du solvant, lors de l'utilisation d'un solvant partiellement hydrosoluble, par agitation  
20 suffisante de ces couches.

Les cuves de purification du pullulane conformément au procédé selon l'invention, doivent former une série de deux ou plus, de préférence trois ou quatre, mais des séries de cinq ou plus s'avèrent désavantageuses à l'échelle industrielle.

30 La présente invention est illustrée plus en détail ci-après au moyen d'un exemple non limitatif.

#### EXEMPLE

On effectue une culture germinative d'Aureobasidium pullulans IFO 4464 par ensemencement de cette souche sur un milieu  
35 liquide stérilisé et refroidi, comprenant 10% (poids/volume) de sirop d'amidon, converti à l'acide jusqu'à un ED (équivalent de dextrose) de 45, 0,2% de  $K_2HPO_4$ , 0,2% de peptone, 0,2% de NaCl, 0,04% de  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$  et 0,001% de  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$  (poids/volume), et on laisse incuber le tout à 27°C pendant 26 heures sous aérobie. On  
40 réalise la culture principale par ensemencement du bouillon de

- culture germinative sur un milieu de composition identique, et avec des conditions d'incubation semblables, mais pour une durée de quatre jours. Après élimination des cellules, le bouillon obtenu est évaporé sous vide à 60°C pour donner une solution ayant une
- 5 teneur en pullulane de 21% (poids/volume).
- La solution, ainsi obtenue, est introduite dans la cuve 6 du dessin. Les cuves 1, 2 et 3 ont chacune une capacité de 1 300 litres et une portion de 1 000 litres de solution aqueuse de méthanol est introduite dans chaque cuve pour obtenir une profondeur de 2 mètres.
- 10 Dans la cuve 1 la concentration en méthanol est ajustée, à 80%, dans la cuve 2 à 90% et dans la cuve 3 à 97% en volume/volume. La solution de pullulane dans la cuve 6 est immédiatement chauffée à 175°C sous une pression de 150 kg/cm<sup>2</sup>, et introduite à la surface de la solution de méthanol dans la cuve 1, par pulvérisation
- 15 à partir d'un ajutage à haute pression 8, avec une vitesse d'écoulement de 200 litres/heure. Les mélanges ainsi obtenus, dans lesquels les particules de pullulane sont mises en suspension dans les cuves 1, 2 et 3, sont respectivement expulsés par les pompes 9, 13 et 15, à la vitesse d'écoulement de 6 000 litres/heure. La
- 20 solution de méthanol à la concentration de 99% (vol./vol.) contenue dans la cuve de stockage du solvant 12, est introduite dans la cuve 3 à la vitesse d'écoulement de 800 litres/heure. La solution de méthanol de la cuve 1, est dirigée vers la colonne de distillation du solvant 11 par l'hydrocyclone 10, à la vitesse d'écoulement de 900 litres/heure. Les quantités de solutions de méthanol, dans les cuves 2 ou 3, sont maintenues à niveaux constants par reflux des hydrocyclones 14 ou 18. Le précipité de pullulane, éliminé par la centrifugeuse 16, est séché à 60°C sous 680 mm de mercure au moyen d'un séchoir à vide tournant 19 pour donner le
- 30 pullulane cherché, et la vapeur de méthanol est récupérée par un réfrigérant.
- On obtient ainsi, à raison de 4,2 kg/heure, du pullulane incolore sous forme pulvérulente, avec une teneur en humidité de l'ordre de 5% et une teneur en sucre résiduaire de 0,1%.

REVENDICATIONS

1. Procédé de purification de pullulane obtenu par culture en milieu liquide d'une souche productrice, suivie de l'élimination des cellules du bouillon résultant, caractérisé en ce que l'on introduit la solution aqueuse de pullulane dans une solution aqueuse de solvant, de manière à obtenir un mélange dans lequel sont en suspension de façon homogène des particules extrêmement fines de pullulane, puis on dirige ce mélange vers une cuve voisine renfermant la même solution de solvant mais à une concentration plus élevée, et l'on répète ces étapes au moins une fois, à l'aide de cuves, disposées en série et renfermant toujours la même solution de solvant mais à des concentrations croissantes.
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'on opère avec une série d'au moins 2 cuves et de préférence 3 ou 4 cuves.
3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, caractérisé en ce que la durée de séjour dans chaque cuve est de 10 à 60 minutes.
4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, caractérisé en ce que la concentration en solvant de la première cuve de la série est légèrement supérieure au minimum nécessaire pour précipiter le pullulane.
5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce que la concentration de la solution de pullulane à purifier est aussi élevée que possible, mais de préférence sans dépasser 40% en poids/volume lors de son introduction au début de la série de cuves de purification.
6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, caractérisé en ce que la solution de pullulane est introduite dans la première cuve de la série sous forme d'un fin brouillard, par pulvérisation au moyen d'un ajutage à pression élevée, par exemple de l'ordre de  $150 \text{ kg/cm}^2$ .
7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, caractérisé en ce que la solution de pullulane est introduite dans la première cuve à une température inférieure à  $200^\circ\text{C}$ .
8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, caractérisé en ce que le solvant est facilement ou partiellement hydrosoluble, en particulier alcool; cétone, ester, éther, et de préférence le méthanol.
9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8, caractérisé en ce



que la solution de pullulane à sa sortie de la dernière cuve est soumise à la centrifugation et le précipité obtenu est séché dans un séchoir à vide.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 9, caractérisé en ce que, lors du passage d'une cuve de purification à l'autre, le mélange solution de pullulane-solution de solvant traverse un hydrocyclone qui sépare ce mélange en une fraction de solution de pullulane allant vers la cuve suivante, et une fraction de solution de solvant qui est recyclée.
11. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la solution de solvant sortant de l'hydrocyclone situé après la première cuve de purification, est envoyée dans une colonne à distiller pour augmenter sa concentration en solvant, la solution ainsi obtenue étant recyclée vers la dernière cuve de purification.
12. Procédé selon la revendication 10, caractérisé en ce que la solution de solvant, sortant de l'hydrocyclone situé après la cuve n+2, est recyclée vers la cuve n, pour empêcher dans celle-ci la dilution de la solution de solvant.
13. Pullulane obtenu sous forme pulvérulente par le procédé selon l'une des revendications précédentes.

Pl. unique

